GE Healthcare
Life Sciences

MicroCal VP-DSC

日本語簡易マニュアル

GE imagination at work

71-3548-31

目次

1. はじめに 4

ご使用の前に 4

設置環境 4

2. 実験をはじめる前に 5

2-1. 示差走査カロリメトリー（DSC）の原理 5

2-2. 概要 6

2-3. 解析データ 7

2-4. サンプルの調製時の注意点 7

2-4-1. 緩衝液組成 7

2-4-2. 有機溶媒の使用 8

2-4-3. 還元剤 8

2-5. VP-DSC 実験のデザイン必要サンプル量 8

2-5-1. 必要濃度 8

2-5-2. スキャン温度 8

2-5-3. スキャン速度と応答速度 8

2-5-4. 熱履歴と再現性 9

2-5-5. サンプルのリフィル 9

3. 測定 10

測定概要 10

3-1. システムのスタートアップ 10

3-2. ThermoVac を使用したサンプル、バッファーの脱気 10

3-3. セルへの溶液の充填 11

3-4. RNase サンプルの測定 13

3-4-1. パラメータ設定 13

3-4-2. 測定スタート 15

3-4-3. 測定中のパラメータの変更方法 15

3-4-4. サンプルのリフィル（サンプル充填） 16

3-4-5. 測定中のデータの表示 16

3-4-6. 測定の停止 17
3-5. 測定終了後の洗浄方法 18
3-6. シャットダウン 19
4. データ解析 20
4-1. 測定データの読み込み 20
4-2. コントロールデータの差し引き 21
4-3. 濃度によるノーマライズ 21
4-4. ベースラインの差し引き 22
4-5. モデルフィッティング 24
4-6. ΔC_p の求め方 27
5. メンテナンス 30
5-1. 毎日のメンテナンス 30
5-2. 毎週のメンテナンス 30
5-3. 長期間使用しない時 30
5-4. その他のメンテナンス 30
汚れがひどい時の洗浄方法（凝集が見られた場合） 30
5-5. システムチェック 31
5-6. 熱量キャリブレーション 33
5-7. 温度キャリブレーション 34
6. 消耗品の品名とコード番号 35

1. はじめに

ご使用の前に

MicroCal VP-DSC を操作するユーザーの皆様は実験前にこの日本語簡易マニュアルをよくお読みいただき、一通りの操作方法を習得の上で本実験に臨んでいただけますようお願いいたします。機器本来のパフォーマンスを十分に発揮させるためだけでなく、誤った操作方法等による装置への取り返しのつかないダメージを防ぐためにも重要です。本装置は pV（ピコボルト）オーダーの電力を取扱うため、非常に高性能、高感度な実験装置であることを十分ご理解の上ご使用いただきますようお願い申し上げます。

設置環境

MicroCal VP-DSC を設置するには、少なくとも通常の実験台（幅 100 cm 程度）が必要となります。PC コントローラつの MicroCal VP-DSC で約 70 cm、ThermoVac で約 25 cm のスペースが必要です。設置場所は風、室温変動、直射日光、振動、強い電場や磁場（NMR や電子レンジ、大型モータ、冷蔵設備など）がないところにしてください。さらに電源（110～240 VAC）が適切に設置され、電圧変動、同期ひずみ、ディップやスパイクが乗っていないことが必要です。

ほとんどの実験室条件下ではこの装置に内蔵の電源フィルタで十分ですが、場合によっては外部ノイズが装置の性能発揮を妨げることがあります。そのような場合には、電源安定装置を併用することが必要になります。電源に起因するトラブルはさまざまな形で現れ、すべてのケースに有効な電源安定化装置はありません。電源安定化装置を購入する場合は、その前に実際に使用する場所で予備テストしてみることをおすすめします。電源由来のトラブルが考えられる場合には、弊社技術サービスにご相談ください。繰り返しになりますが、エアコンのオン・オフに伴う室温変動、室内の風、あるいは装置への直射日光、空間電磁波などは動作に微妙に影響しますから十分にお気をつけください。

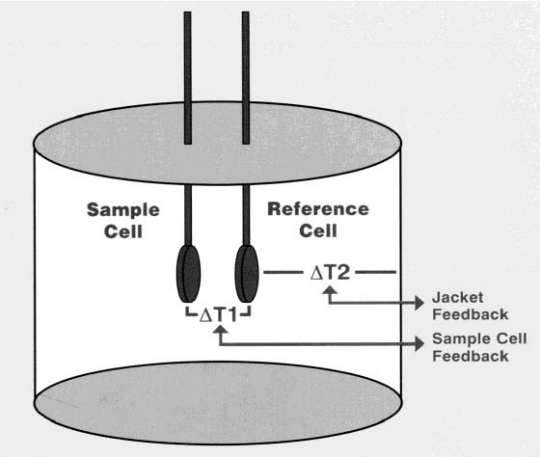
2. 実験をはじめる前に

2-1. 示差走査カロリメトリー（DSC）の原理

示差走査型カロリメーター（以下 DSC）温度を一定速度で上昇させた時に試料物質が転移もしくは変性した時の熱変化を測定します。

DSC のサーマルコアには半導体センサが 2 つのコイン型セル（サンプルセルとリファレンスセル）に挟まれた構造をしています。セルの材質は耐薬品性、熱伝導性に優れたタンタル(Tantaloy61™)で、容量は両セルとも 500 µl です。セルの外側にはそれぞれヒータが装着されています。セルは二重の断熱ジャケットに覆われ、セル内部がジャケット外部の環境から熱的に遮断された系になるように設計されています。(下図では内部のジャケットのみ記載)。サンプルセル、リファレンスセルには導入管がついており、この導入管を通じて溶液の充填、回収、洗浄を行います。

サンプルセルに測定したいサンプルを、リファレンスセルにはサンプルを溶かした溶液を入れ、一定速度で温度を上昇させます。サンプルセルで何も反応が起こっていない時には、サンプルセルとリファレンスセルの温度差（ΔT1）がゼロに制御されています。サンプルセル内で転移や変性が起きると、リファレンスセルに比べてサンプルセルが発熱、吸熱を生じ、2 つのセル間に温度差（ΔT1）が生じます。この温度差を半導体熱伝導センサが検知し、温度差（ΔT1）をゼロにするよう、サンプルセルへ供給されている電力を増加、または減少させます。この平衡維持のために入力されるフィードバック電力の変化（熱量変化=DP 変化）を直接プロットすることで、転移などによって生じた熱量を測定することが可能になっています。



MicroCal VP-DSC システム略図

2-2. 概要

図 2. MicroCal VP-DSC System

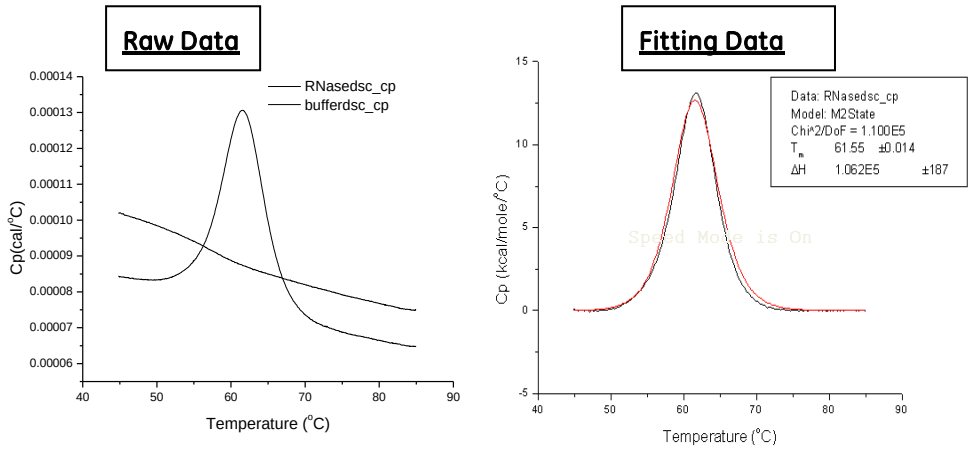
MicroCal VP-DSC 示差走査型カロリメーターを用いて、サンプルの安定性や転移に関する詳細な知見を得ることができます。

リファレンスセルにはサンプルを溶解したバッファーを充填します。サンプルセルにはサンプルを充填します。セル温度は 1～130℃の範囲で設定可能で、昇温速度は最大 90℃/hr で測定を行うことができます。付属の圧力キャップを使用することにより、0 - 30 psi (耐圧 80 psi) の圧力下で測定を行うことができます

指定された温度範囲内を一定の速度でスキャンを行い、転移や変性によって生じた熱量を測定し、Origin ソフトウェアを用いて得られたデータを解析します。モデルフィッティングを行い、転移中点温度 (T_m)、カロリメトリックエンタルピー変化 (ΔH)、熱容量変化 (ΔC_p)などを算出することができます。

2-3. 解析データ

測定が終了すると Raw Data が得られます。Raw Data を Origin ソフトウェアで解析することにより、転移中点温度（T_m）、エンタルピー変化（ΔH）、熱容量変化（ΔC_p）などを算出することができます。



2-4. サンプルの調製時の注意点

MicroCal VP-DSC の測定では、サンプルセルとリファレンスセルは同一のバッファーを使用することにより、サンプルの変性もしくは転移により発生する熱変化を測定します。

リファレンスセルにはサンプルを溶解したバッファーを充填しますが、高分子のサンプルでは透析などにより測定に用いるバッファーに調製します。

透析外液のバッファーは、DSC 測定時にリファレンスセルへの充填、コントロールスキャン（バッファースキャン）、サンプルセルの洗浄等に使用しますので、あらかじめ測定に必要な量を取り分けて保存してください。

2-4-1. 緩衝液組成

使用するバッファーに特に制限はありませんが、できる限り pH の温度依存性の低い、プロトン化エンタルピーの低いものを選ぶのが理想的です。よく使われているバッファーには、グリシン、酢酸、リン酸緩衝液などがあります。Tris などの Good の緩衝液は pH の温度依存性が大きいため、場合によっては測定中の pH 変化の影響があるため注意が必要です。

2-4-2. 有機溶媒の使用

水と有機溶媒では熱容量が大きく異なりますので、DMSO などを使用する場合は、サンプルセル、リファレンス共に同一濃度になるように調製してください。

2-4-3. 還元剤

DTT など一部の還元剤によって、ベースラインのドリフトが起こることがあります。タンパク質の安定のために還元剤が必要である場合には、β-メルカプトエタノールまたは TCEP（トリス[2-カルボキシエチルホスフィン]塩酸塩）の使用を推奨します。

（ただし、DTT で影響のでない場合もあります）

2-5. VP-DSC 実験のデザイン必要サンプル量

MicroCal VP-DSC の 1 回の測定に必要なサンプル量は 700 ～ µl です。

リファレンスセル用として、サンプルを溶解したバッファー700 ～ µl が必要です。

2-5-1. 必要濃度

MicroCal VP-DSC の測定では、1 mg/ml 程度のサンプル濃度を推奨します。サンプルに依存しますが、最小で 0.02 mg/ml 程度以上の濃度が必要です。

2-5-2. スキャン温度

MicroCal VP-DSC はセル温度を 1～130℃の範囲で設定することができます。

セル内で溶液が凝固するとセルが破損する可能性がありますので、凝固が起こらない温度範囲内でご使用ください。バッファーを使用してタンパク質の安定性の評価を行う場合、10～110℃程度の温度範囲でスキャンするのが一般的です。

2-5-3. スキャン速度と応答速度

MicroCal VP-DSC は最大 90℃/hr で測定することができます。転移の遅いタンパク質の場合は、60-90℃/h 程度での測定が一般的です。濃度が薄いサンプルの場合、スキャン速度を上げることによりピークを検出できる可能性があります。またサンプルの転移の性質により、フィードバックモードを設定します。転移が早いサンプルは High で測定する必要がありますが、High になるほどノイズは大きくなります。

一般的な目安として、

High：脂質

Mid：DNA、RNA

Low, None：タンパク質

のように、サンプルの転移の早さによってフィードバックモードを変えることができます。

2-5-4. 熱履歴と再現性

サンプルを測定する前に、サンプル測定と同じパラメータでコントロールスキャン（バッファースキャン）を数回繰り返します。

一般的に、1 スキャン目データのみが 2 スキャン目以降のデータとは異なった位置と形で出てきます。これは 1 スキャン目の前の“熱履歴”が 2 スキャン目以降と違うために起こります。1 スキャン目の前は装置が一定温度にある状態でしたが、2 スキャン目以降は前サイクルで温度スキャンされた後、測定開始温度まで変化させた後に測定スキャンがはじめります。

このように、1 スキャン目は 2 スキャン目以降と測定が開始される前の状態が異なるので、他のスキャンとは異なった形で出てきます。同じパラメータで測定する 3 スキャン目以降はスキャン間の再現性が高くなる傾向があります。

熱履歴が安定した状態でサンプル測定が行るよう、サンプル測定の前日から一晩、コントロールスキャン（バッファースキャン）を行っておくことをおすすめします。

2-5-5. サンプルのリフィル

前述の熱履歴と関係しますが、再現性のよいデータを取るためにはコントロールスキャン（バッファースキャン）から、サンプルスキャンに入れ替えるタイミングが重要になります。連続スキャンを止めることなく、バッファースキャン終了後のクーリング時に、適切な温度まで下がったところで、圧力キャップをあけて素早くサンプルのリフィルを行います。

(注) 同一バッファーで測定を行う場合は、リファレンスセルのリフィルは必要ありません。

3. 測定

この MicroCal VP-DSC 日本語取扱説明書では Test Kit, DSC, RNase / 2'CMP（カタログ番号 KIT100010）を用いた測定を例に取扱説明を行います。

測定概要

1. システムのスタートアップと準備
2. RNase の転移中点温度 T_m 値とエンタルピー変化（ΔH)を算出するための実験条件の設定
3. 結果の評価

3-1. システムのスタートアップ

1. PC、モニターと装置の背面にある MicroCal VP-DSC の電源スイッチを入れます。
2. デスクトップ上の ***VPViewer2000*** のアイコンをダブルクリックし、測定制御用ソフトウェアを起動します。
3. システムの初期化プロセスの後に、*MicroCal VP-DSC* 測定制御用ソフトウェアが開きます。装置前面のランプが点灯していることを確認してください。
4. 測定制御用ソフトウェアは、*VPViewer2000 Main Window* と *Origin7.0 Real Time Plot* の 2 つのウィンドウ画面から構成されます。

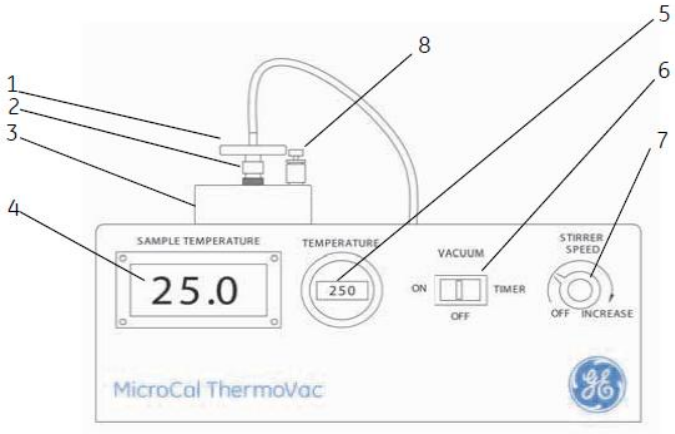
(注) サンプルセル、リファレンスセルの両方に、サンプルを溶解させたバッファーを充填して、コントロールスキャンをあらかじめ行い、熱履歴を安定させてからサンプル測定してください。サンプル測定の前日から一晩バッファースキャンを実施しておくことをおすすめします。

3-2. ThermoVac を使用したサンプル、バッファーの脱気

セルにサンプルやバッファーを注入する前に、ThermoVac を使用して脱気をします。セル内に気泡が入ったまま測定してしまいますと、温度むらを生じてベースラインのノイズが大きくなる恐れがあります。

1. ThermoVac の機器背面にある電源装置のスイッチを入れ、温度調節つまみを回し、測定温度よりも 3～4℃低い温度に設定します。
2. ThermoVac にサンプルを充填したチューブをセットし、撹拌調節つまみを中程度に回します。
3. アクリルカバーの減圧調節弁を反時計回りに回し減圧弁を事前に開放しておきます。

4. vacuum のスイッチを左側にして、アクリルカバーと O リングを密着させながら、減圧弁を時計回りにゆっくりと閉めていき、気泡が出ることを確認したら反時計周りに戻し液があふれないようにします。
5. 3～5 分程度脱気してください。
6. 脱気が終わりましたら、アクリルカバーの減圧弁を反時計回りに回して開放し、vacuum のスイッチを右側に動かして脱気を止め、サンプルの入ったチューブを取り出します。



ThermoVac

1	インラインフィルタ
2	ルアーロックコネクター
3	アクリルカバー
4	サンプル温度表示
5	設定温度
6	vacuum スイッチ
7	撹拌調節つまみ
8	減圧弁

3-3. セルへの溶液の充填

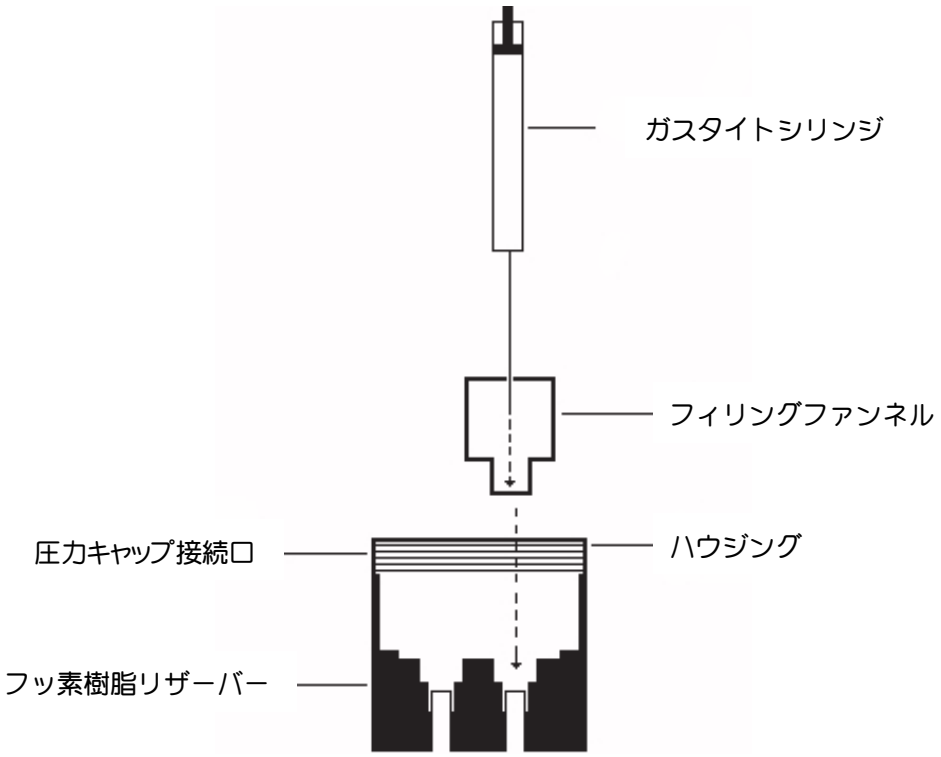
1. 圧力キャップを反時計回りに回し、キャップを外します。キャップは 2 重構造になっており、まず上部のフッ素樹脂部分を緩め、続けて下部の金属部分を緩めて取り外します。
2. 圧力センサに圧力プラグをつます。
3. リファレンスセルにフィリングファンネルをつます。
4. ガスタイトシリンジを使用して、セルに充填されている溶液を吸い取ります。
5. 充填する溶液をガスタイトシリンジを用いてセルに注入します。
6. ゆっくりとプランジャーを下げていき、フィリングファンネルの下部から溶液が見えてくるまで充填します。フィリングファンネルの下部から溶液が確認できた時点で溶液の充填を一旦止めてください。シリンジプランジャーを上下に早いスピードで 2-3 回動かすことで、セル内の気泡を追い出します。
7. フィリングファンネルを外します。
8. フィリングアジャストシリンジを使用して、リファレンスセルの余分な溶液を吸い上げ、セル液面の高さを調整します。

9. 同様の操作(手順 3.～8.で、サンプルセルにも溶液を充填します。

10. 圧力センサにつた圧力プラグを外し、圧力キャップを時計回りに回して閉めてください。この時圧力が 27 psi よりも大幅に落ちているようであれば、圧力キャップが摩耗しているため交換が必要です。

(注)サンプル、バッファー、洗浄溶液の充填は、シリンジ先端部分によるセルへの衝撃・破損を防ぐため、必ずフィリングファンネルを使用して行ってください。

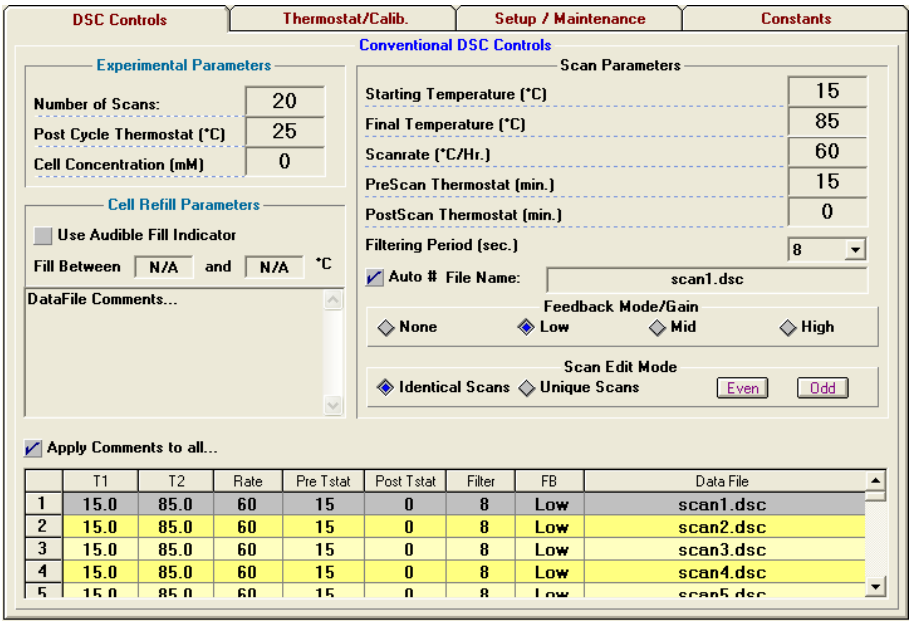
(注)セルから溶液を取り出す場合は、必ずセルの温度が 50℃以下になってから操作するようにしてください。高温の場合、溶液でインジェクションシリンジが破損する恐れがあります。



3-4. RNase サンプルの測定

3-4-1. パラメータ設定

1. ***VPViewer2000*** の *Main Window* で ***DSC Controls*** タブをクリックします。
2. ***Scan Edit Mode*** を ***Identical Scans*** に設定し、以下のパラメータを入力します。


DSC Controls
Thermostat/Calib.
Setup / Maintenance
Constants
Conventional DSC Controls
Experimental Parameters
Number of Scans: 20
Post Cycle Thermostat (°C) 25
Cell Concentration (mM) 0
Cell Refill Parameters
Use Audible Fill Indicator
Fill Between N/A and N/A °C
DataFile Comments...
Scan Parameters
Starting Temperature (°C) 15
Final Temperature (°C) 85
Scanrate (°C/Hr.) 60
PreScan Thermostat (min.) 15
PostScan Thermostat (min.) 0
Filtering Period (sec.) 8
Auto # File Name: scan1.dsc
Feedback Mode/Gain
None Low Mid High
Scan Edit Mode
Identical Scans Unique Scans Even Odd
Apply Comments to all...
T1 T2 Rate Pre Tstat Post Tstat Filter FB Data File
1 15.0 85.0 60 15 0 8 Low scan1.dsc
2 15.0 85.0 60 15 0 8 Low scan2.dsc
3 15.0 85.0 60 15 0 8 Low scan3.dsc
4 15.0 85.0 60 15 0 8 Low scan4.dsc

Experimental Parameters

Number of Scans :	20	測定の回数
Post Cycle Thermostat (℃) :	25	測定終了後のセル温度
Cell Concentration (mM) :	0	測定サンプルの濃度

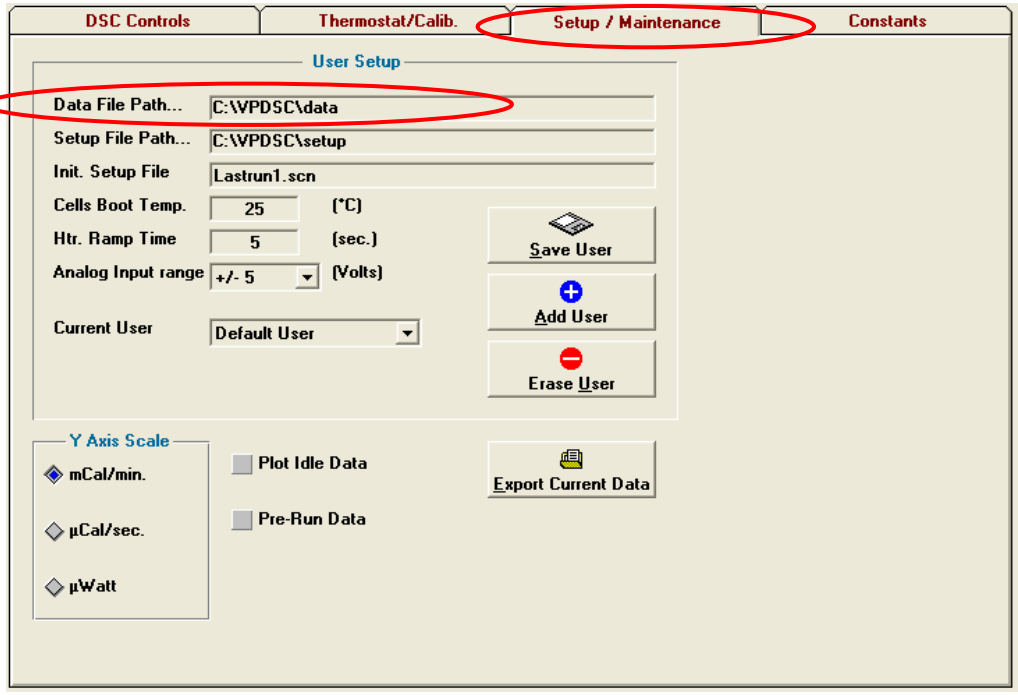
Scan Parameters

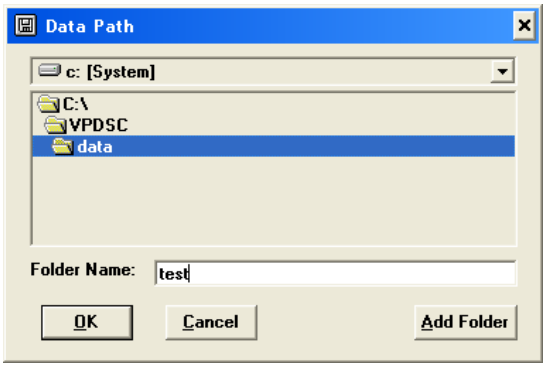
Starting Temperature (℃) :	15	測定開始温度
Final Temperature (℃) :	85	測定終了温度
ScanRate (℃/Hr) :	60	昇温速度
PreScan Thermostat (min) :	15	スキャン前の安定化時間
PostScan Thermostat (min) :	0	スキャン終了後の温度による保持時間
Filtering Period (sec) :	8	データの取り込み時間間隔

(注) セル内で溶液が凝固するとセルが破損する可能性がありますので、凝固が起こらない温度範囲内でご使用ください。

3. ***Feed Back Mode/Gain*** は ***Low*** を選択します。
4. ***File Name*** にファイル名を入力します。

   ファイルの保存先フォルダは ***Setup / Maintenance*** タブをクリックして ***Data File Path...*** で確認できます。変更する場合は、***Data File Path*** 名をダブルクリックしてフォルダを選択・変更することができます。





データ保存先フォルダ設定画面

【参考】***Feed Back Mode/Gain*** :DP の応答速度の設定

フィードバックモード/ゲインには ***High***、***Mid***、***Low***、***None*** の 4 つがあります。

転移が早いサンプルは ***High*** で測定する必要がありますが、*High* になる程ノイズは大きくなります。

【参考】***FeedBackMode*** と ***Filtering Period*** の関係

FeedBackMode には 4 つのモードがあります。目安としてそれぞれのフィードバックの早さの 1/3 の **Filtering Period** にします。

FeedBackMode	*High*	*Mid*	*Low*	*None*
Feedback の速さ (sec)	5	12	24	45
Filtering Period (sec)	**2**	**4**	**8**	**16**
Sample 例	脂質	DNA	タンパク質	タンパク質

【参考】***Scan Edit Mode*** について

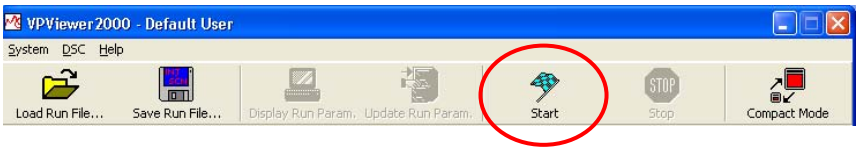
Identical Scans：測定パラメータを全スキャンに適応する場合に選択

Unique Scans：測定パラメータを選択したスキャンのみ変える場合に選択

Even/Odd：奇数のみまたは偶数のみを同じパラメータにする場合に選択

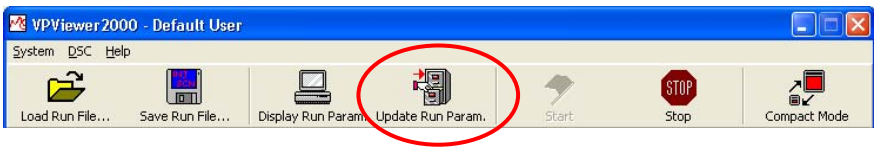
3-4-2. 測定スタート

Start ボタンを押すと測定がスタートします。



3-4-3. 測定中のパラメータの変更方法

1. 測定中に ***Scan Parameters*** を変更したい場合、テーブルで変更したいインジェクションナンバーを選択します。指定された行がハイライトされます。
2. 指定の測定サイクルのパラメータのみ変更する場合は、***Scan Edit Mode*** で ***Unique Scans*** を選択して、上段の入力用カラム中の数値を変更します。
   指定のサイクル以降をすべて同じパラメータに変更したい場合は、***Scan Edit Mode*** で ***Identical Scans*** を選択してから数値を変更します。
3. ***Update Run Parameters*** をクリックして変更を確定させます。



4. ***Display Run Parameters*** をクリックしてパラメータの変更確認を行います。

3-4-4. サンプルのリフィル（サンプル充填）

1. バッファースキャンを繰り返し、熱履歴が安定したことを確認します。
   (注) 熱履歴の安定化には時間を要しますので、あらかじめ前日からバッファースキャンを連続して行うことをおすすめします。
2. バッファースキャン（昇温）が終わり、クーリングで室温付近（例 15～25℃）になった時点で圧力キャップを開けます。
3. サンプルセルに入っているバッファーを抜き取り、サンプルをリフィルします。
   （セルへの充填手順は、P.11. 3-3. セルへの溶液の充填を参照ください）
4. 圧力キャップを閉めます。

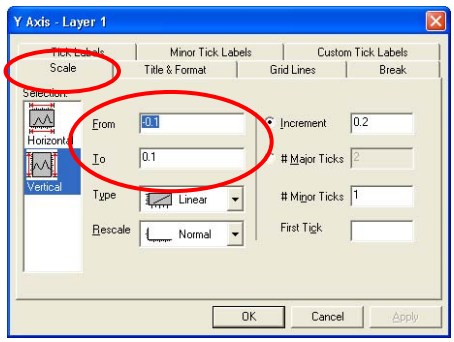
(注) サンプル、バッファー、洗浄溶液の充填は、シリンジ先端部分によるセルへの衝撃・破損を防ぐため、必ずフィリングファンネルを使用して行ってください。

(注) セルから溶液を取り出す場合は、必ずセルの温度が 50℃以下になってから操作するようにしてください。高温の場合、溶液でインジェクションシリンジが破損する恐れがあります。

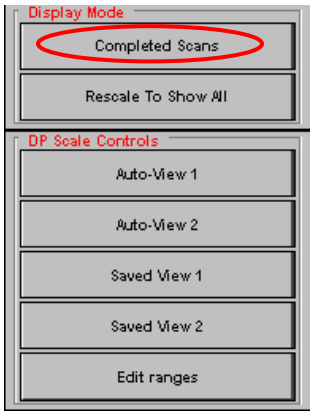
3-4-5. 測定中のデータの表示

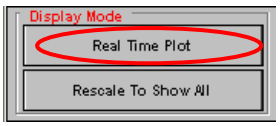
1. 測定中のデータは ***Origin7.0 Real Time Plot*** で確認することができます。
   測定中のデータをすべて表示させる場合は、画面左下の ***Display Mode*** の ***Rescale To Show All*** ボタンを押します。

2. データの表示スケールを変更したい場合は、X 軸もしくは Y 軸上でダブルクリックした後 ***Scale*** タブを選択して ***From, To*** で数値を変更して、***OK*** を押します。



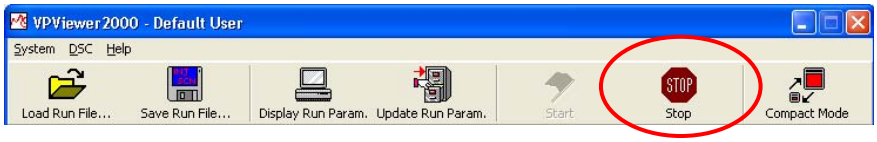
3. スキャンが終了したデータを確認する場合は、***Display Mode*** の ***Completed Scans*** ボタンを押します。測定中のデータ表示に戻る時は、***Real Time Plot*** ボタンを押します。





3-4-6. 測定の停止

1. 測定開始後に停止させる場合は ***Stop*** をクリックします。



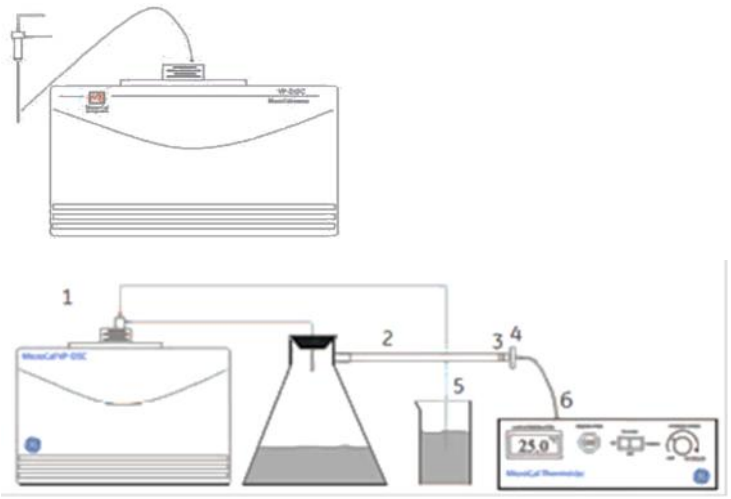
3-5. 測定終了後の洗浄方法

1. 測定終了後、セルに入っているサンプルもしくはバッファーをガスタイトシリンジを用いて抜き取り、サンプルセル、リファレンスセル共に使用したバッファーで洗浄します。
   この操作を 3 回繰り返します。
   （セルへの充填手順は、P.11. 3-3. セルへの溶液の充填を参照して、フィリングファンネルを使用して行ってください）

(注) サンプル、バッファー、洗浄溶液の充填は、シリンジ先端部分によるセルへの衝撃・破損を防ぐため、必ずフィリングファンネルを使用して行ってください。

（注）セルから溶液を取り出す場合は、必ずセルの温度が 50℃以下になってから操作するようにしてください。高温の場合、溶液でインジェクションシリンジが破損する恐れがあります。

2. 20% Contrad-70 (Decon90) 溶液を 600 ml 作成しビーカーにセットします。
3. サンプルセルからセル内に残っている溶液をガスタイトシリンジで取り除きます。
4. セルクリーニングデバイスをサンプルセルに差込み、O リングでシールされるまで押し込んでください。下図のようにセルクリーニングデバイスのチューブを接続します。



1	VP-DSC システム本体
2	ThermoVac による吸引
3	ルアーロックコネクター
4	インラインフィルタ
5	20% Contrad-70 溶液
6	バキュームポート

ThermoVac の接続

5. ThermoVac の電源を入れます。
6. 20% Contrad-70 (Decon90) 溶液を約 300 ml 吸引後、別ビーカーに準備した超純水を約 300 ml 吸引します。
7. セルクリーニングデバイスをサンプルセルから外し、セル内に残っている水をガスタイトシリンジで取り除き、超純水を充填しておきます。
8. セルクリーニングデバイスをリファレンスセルに差込み、3.～7.の操作をサンプルセルと同様に実施します。

（注）セルはタンタルという金属で作られています。タンタルは薬品耐性の高い金属ですが、ガラスに近く、酸性には強いですがアルカリには比較的弱いため、洗浄溶液を入れたままの長時間の放置は避けてください。

(注) Contrad-70 は Decon Laboratories 社の製品で、ドデシルベンゼンスルホン酸、水酸化カリウム、クエン酸ナトリウム、ラウリルエーテル硫酸ナトリウムなどを含んでいます。
この物質は極めて腐食性が強く、特に昇温した場合には十分な注意が必要です。目、皮膚、着衣には防護具を用いてください。

3-6. シャットダウン

洗浄を行った後、サンプルセル、リファレンスセル内に超純水が充填してあることを確認してください。確認後、以下の操作でシステムのシャットダウンを行います。

1. ***VPViewer2000*** *Main Window* 画面の ***System*** から ***Quit Program***、または画面右上の をクリックします。
2. VP-DSC システム背面の電源を Off にします。
3. PC をシャットダウンします。
4. 電源安定化装置、または UPS が備え付けられている場合は、これらの電源を Off にします。

【参考】

システムの電源は On のままでも問題はありません。On の状態であるほうが機器は安定します。

4. データ解析

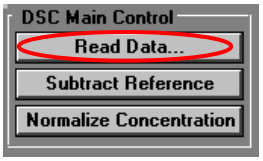
ここでは、RNase の実験で得られたデータを例に DSC データの解析方法を説明します。

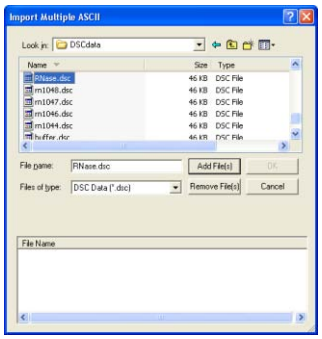
4-1. 測定データの読み込み

1. Origin DSC ソフトウェアを開きます。デスクトップ上にある ***Microcal, LLC DSC*** のアイコンをダブルクリックします。

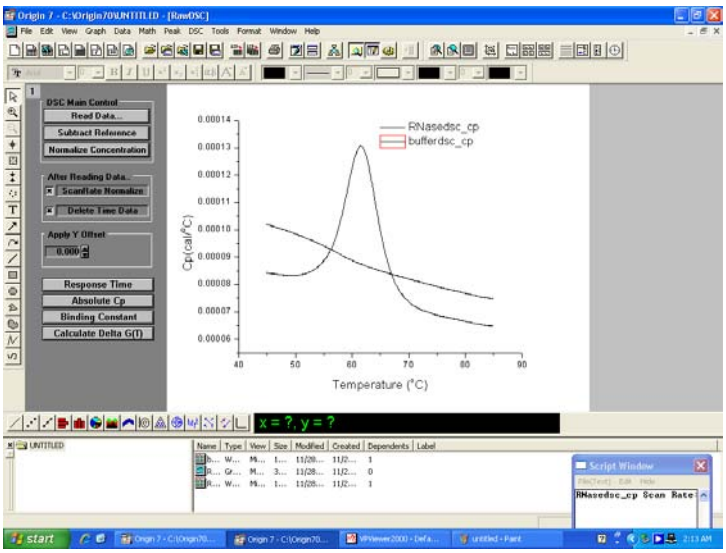
2. 画面左上の ***DSC Main Control*** の ***Read Data*** をクリックして、目的のデータファイル(.dsc ファイル)を開きます。

   複数のファイル(例えば、サンプルデータとバッファーデータ)を同時に開く場合はそれぞれデータを選択して、***Add File(s)***をクリックした後に ***OK*** をクリックします。





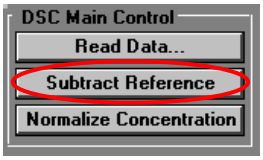
3. 選択したデータが以下のように表示されます。



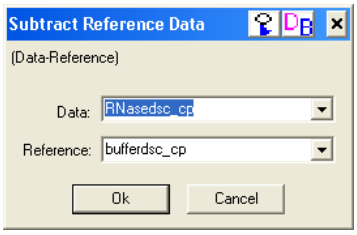
4-2. コントロールデータの差し引き

サンプルデータからコントロールデータを差し引きします。

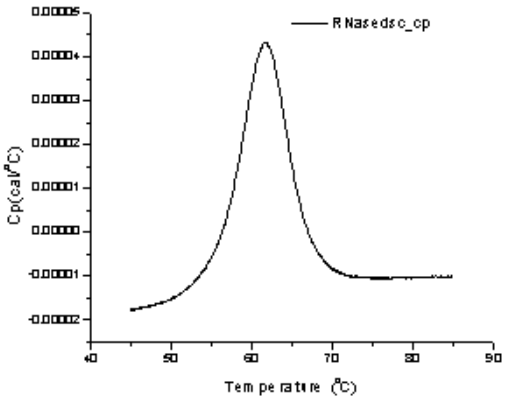
1. 画面左上の ***DSC Main Control*** の ***Subtract Reference*** ボタンをクリックします。



2. ***Subtract Reference Data*** ウィンドウでプルダウンリストからデータの指定を行います。***Data*** にはサンプルデータを、***Reference*** にはコントロールデータ（バッファースキャンデータ）を選択して OK をクリックします。



3. コントロールデータが差し引かれたサンプルデータが以下のように表示されます。

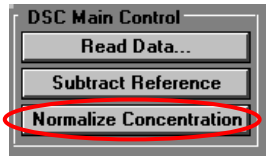


4-3. 濃度によるノーマライズ

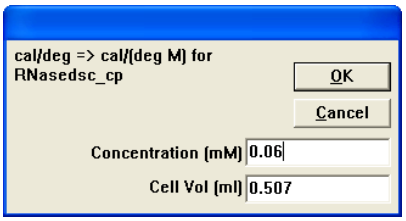
コントロールを差し引いた後、データをモル当たりの熱量データにノーマライズします。

縦軸の単位は cal / ℃ から kcal / mol/ ℃ へ変換されます。

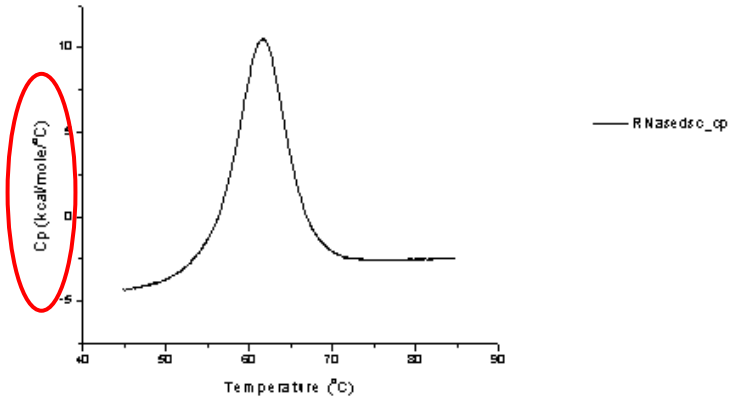
1. 画面左上の ***DSC Main Control*** の ***Normalize Concentration*** ボタンをクリックします。



2. 下図ウィンドウで ***Concentration (mM)*** にサンプル濃度 mM の単位で入力して ***OK*** をクリックします。下段の ***Cell Vol (ml)*** は自動的に入力されるため、入力の必要はありません。



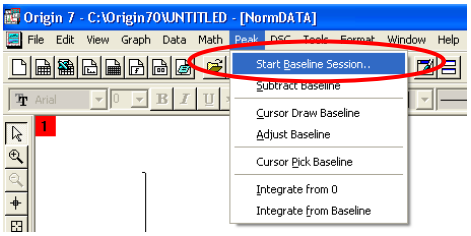
3. ノーマライズされたデータが以下のように表示されます。縦軸の単位は cal / ℃ から kcal / mol/ ℃ へ変換されます。



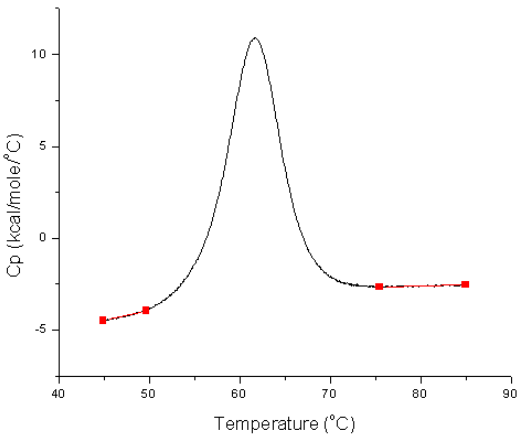
4-4. ベースラインの差し引き

ノーマライズされたデータをモデルフィッティングにより解析を行うためにベースラインの差し引きを行います。

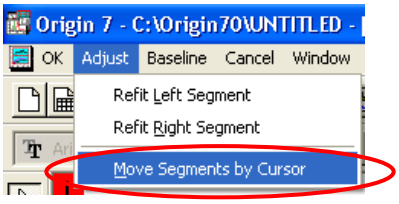
1. メニューバーの ***Peak*** から ***Start Baseline Session*** を選択します。



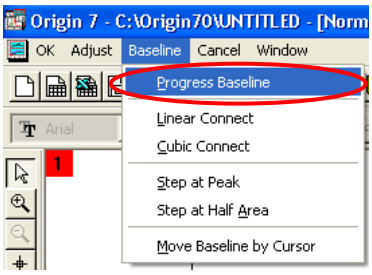
2. ベースラインを決定するためのセグメントがピークの前後に以下のように表示されます。



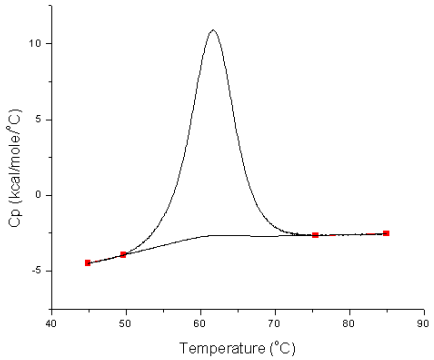
3. セグメントの調整が必要であれば、メニューバーの ***Adjust*** から ***Move Segments by Cursor*** を選択した後、ポインタをドラッグして調整を行います。



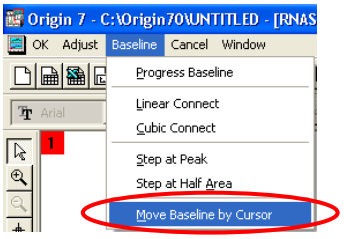
4. メニューバーの ***Baseline*** から ***Progress Baseline*** を選択します。両セグメントをつないだベースラインが自動的に生成されます。



5. 以下のように作成されたベースラインが表示されます。



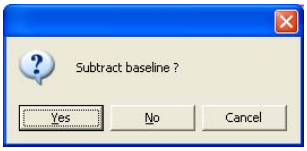
6. ベースラインの調整が必要であれば、メニューバーの ***Baseline*** から ***Move Baseline by Cursor*** を選択した後、ポインタをドラッグしてベースラインの調整を行います。



7. ベースラインを作成したら、メニューバーの *OK* を選択します。

8. ***Subtract baseline?*** で ***Yes*** をクリックします。

(注) モデルフィッティングでΔC_pを算出するモデル (**2 State w/dCp, Dissoc w/dCp**)を使用する場合はこのステップで ***No*** をクリックします。



9. ベースラインが差し引かれたデータが表示されます。
(前項 8 で ***No*** を選択した場合はベースラインの作成のみで、サンプルデータからの差し引きは行われません)

4-5. モデルフィッティング

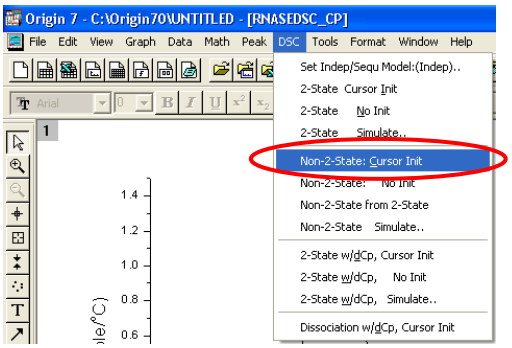
Origin には熱転移を解析するための、以下の 4 つのモデルがあらかじめ用意されています。

1. **2 State モデル**
   2 状態転移モデルです。
   T_m, ΔH を算出することができます。
2. **Non 2 State モデル**
   転移に中間状態が存在する、非 2 状態転移モデルです。
   T_m, ΔH, ΔHv を算出することができます。
3. **2 State w/dCp**
   2 状態転移において転移前と転移後のΔC_p 熱容量変化も同時に決定するモデルです。
   T_m, ΔH, ΔC_p を算出することができます。
4. **Dissoc w/dCp**
   サブユニットの解離を伴う熱転移モデルです。
   T_m, ΔH, ΔC_p, n を算出することができます。

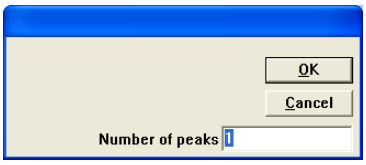
   <u>各パラメータについて</u>
   T_m: 変性中点温度
   ΔH: カロリメトリックエンタルピー変化
   ΔHv: ファントホッフエンタルピー変化
   ΔC_p: 熱容量変化
   n: サブユニット数

ここでは ***Non 2* State モデル**を用いたフィッティングにより、RNAase 測定データから転移中点温度(T_m)とエンタルピー変化(ΔH)を算出します。
このモデルではベースラインを差し引いたデータを使用し、フィッティングにより T_m, ΔH, ΔHv が算出されますので、ΔHv (ファントホッフエンタルピー変化) とΔH (カロリメトリックエンタルピー変化)を比較して、2 状態転移か非 2 状態転移かを判断します。

1. メニューバーの ***DSC*** から ***Non-2-State: Cursor Init*** を選択します。

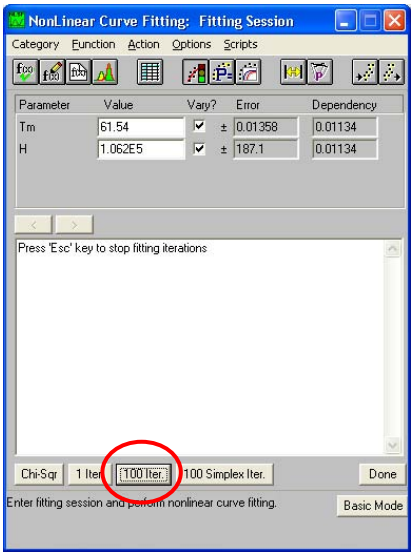


2. 転移ピークの数を ***1*** と入力します。

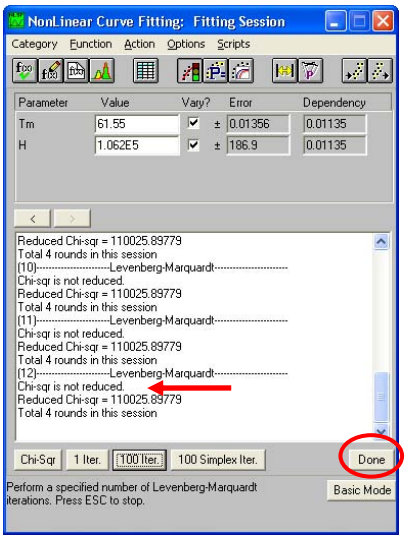


3. データ上のピーク付近をダブルクリックして、T_m の初期値を決定します。
イニシャライズされると、***Done init with fixed T_m's*** と表示されますので、***OK*** をクリックします。

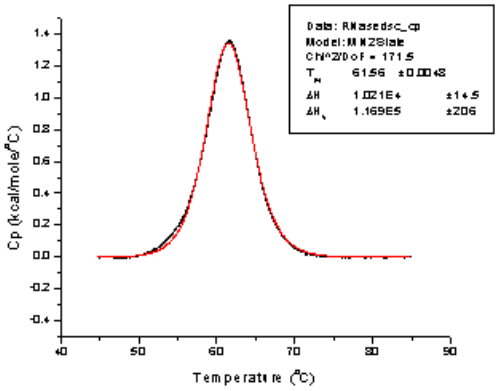
4. フィッティング・セッションのダイアログ・ボックスが開き、最初のフィッティングと変性中点温度（T_m）、およびエンタルピー変化（ΔH）の値が表示されます。
100 Iter ボタンをクリックしてフィッティングを開始します。


NonLinear Curve Fitting: Fitting Session
Category Function Action Options Scripts
Parameter Value Vary? Error Dependency
Tm 61.54 ± 0.01358 0.01134
H 1.062E5 ± 187.1 0.01134
Press 'Esc' key to stop fitting iterations
Chi-Sqr 1 Iter 100 Iter 100 Simplex Iter. Done
Enter fitting session and perform nonlinear curve fitting.
Basic Mode

5. ***Reduced Chi-sqr*** 値（←）が「***Chi-sqr is not reduced.***」と表示されるまでこれを繰り返します。***Done*** をクリックしてフィッティングを終了します。



6. データ上にフィッティングカーブがプロットされ、決定されたパラメータが表示されます。



【参考】

File から ***Export Page...*** を選ぶと、ファイルの種類を変えて（PDF、TIF など）解析結果を保存することができます。

4-6. ΔC_p の求め方

ΔC_p を求める場合はベースラインの差し引きを行いません。求め方は 2 種類あります。

1) フィッティングをかける方法
2) マニュアルで算出する方法

まずは 1) フィッティングをかけていただき、フィッティングがうまくかからなかった場合に 2) マニュアルで算出する方法を実施してください。

1) フィッティングをかける方法

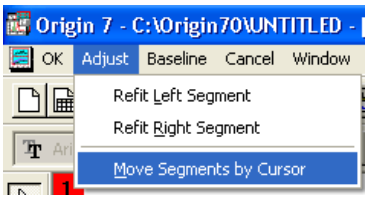
1. データの編集作業を P.20. 4-1.測定データの読み込み ～ P.21. 4-3.濃度によるノーマライズまで実施します。
2. P.22.4-4.ベースラインの差し引きの 1. ～ 8.のステップを実施します。
3. 「***Subtract Reference***」のメッセージが現れますので ***No*** をクリックします。
4. メニューバーの ***DSC*** から ***2-State w/dCP, Cursor Init*** を選択します。
5. 転移ピークの数を入力します。
6. データ上のピーク付近をダブルクリックして、*Tm* の初期値を決定します。
7. イニシャライズされると、***Done init with fixed Tm's*** と表示されますので、***OK*** をクリックします。
8. フィッティング・セッションのダイアログ・ボックスが開きますので、***100 Iter*** ボタンをクリックしてフィッティングを開始します。
9. ***Reduced Chi-sqr*** 値が「***Chi-sqr is not reduced.***」と表示されるまでこれを繰り返します。***Done*** をクリックしてフィッティングを終了します。
10. データ上にフィッティングカーブがプロットされ、決定されたパラメータが表示されます。

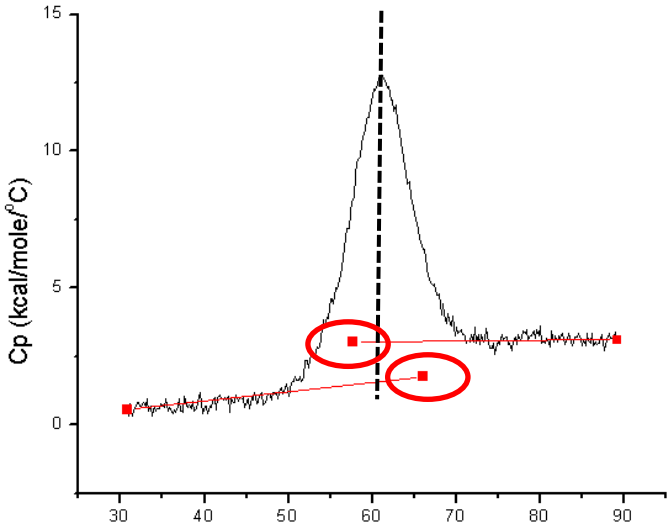
2）マニュアルで算出する方法

1. データの編集作業を P.20. 4-1. 測定データの読み込みから P.21. 4-3. 濃度によるノーマライズまで実施します。

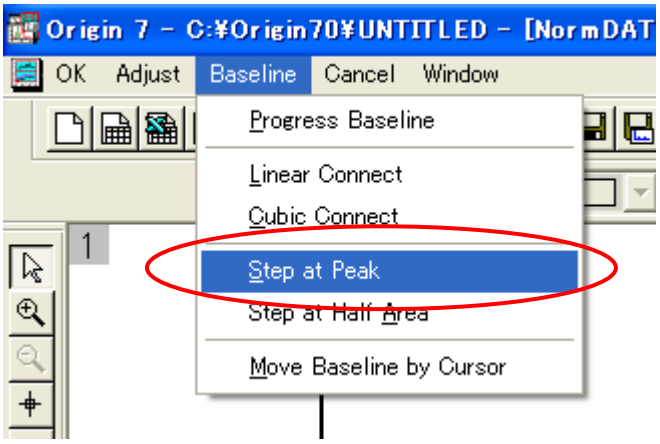
2. P.22. 4-4. ベースラインの差し引きの 1,～2.のステップを実施します。

3. セグメントの調整を行います。メニューバーの ***Adjust*** から ***Move Segments by Cursor*** を選択した後、ポインタをドラッグして、それぞれのそれぞれのベースラインがピークトップを超えるように（ ）調整し、***Enter*** で確定します。

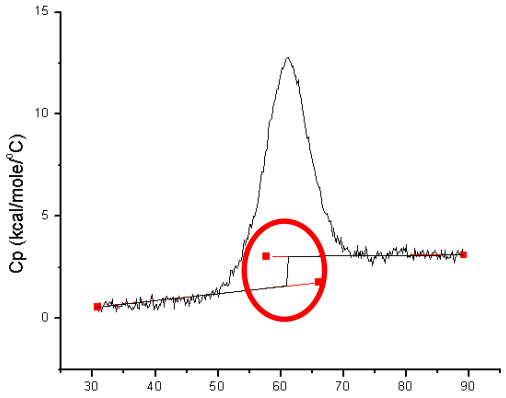




4. メニューバーの ***Baseline*** から ***Step at Peak*** を選択します。



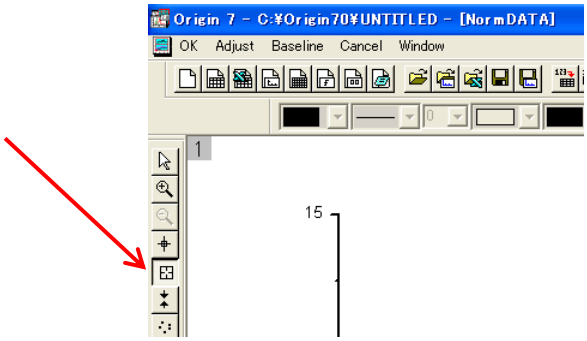
5. ピークトップのところで Native 状態と Denature 状態のベースラインをつないだ線が引かれます。



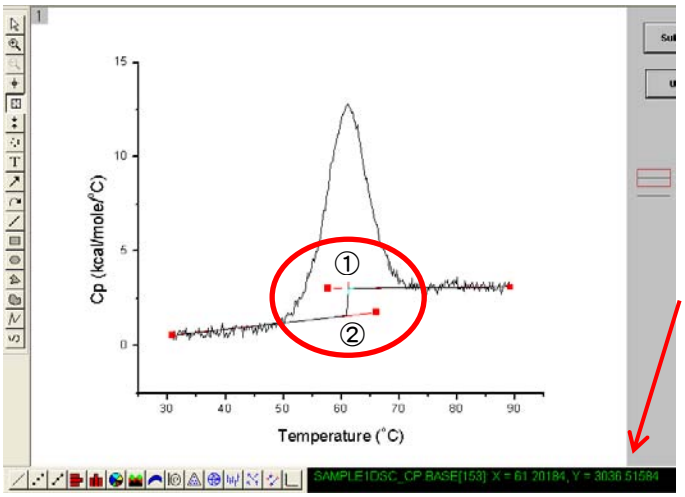
6. ベースラインを作成したら、メニューバーの ***OK*** を選択します。

7. *Subtract baseline?* で ***No*** をクリックします。

8. 画面左側にある ***Data Reader*** をクリックすると、マウスの形が変わります。



9. ***Data Reader*** を○で囲んだ角でクリックすると画面下に Y 軸の値が表示されますので(←)その値をメモします。***Data Reader*** はキーボードの左右矢印で移動できます。①の値から②の値を差し引いたものがΔC_pとなります。



5. メンテナンス

MicroCal VP-DSC の定期的メンテナンスは、信頼性のある結果を得るために最も重要となります。システム内での微生物増殖やタンパク質吸着などのコンタミネーションを避けることが重要です。

5-1. 毎日のメンテナンス

P.18. 3-5. 測定終了後の洗浄方法を実施してください。

5-2. 毎週のメンテナンス

サンプルセル、リファレンスセル内の超純水を交換してください。

5-3. 長期間使用しない時

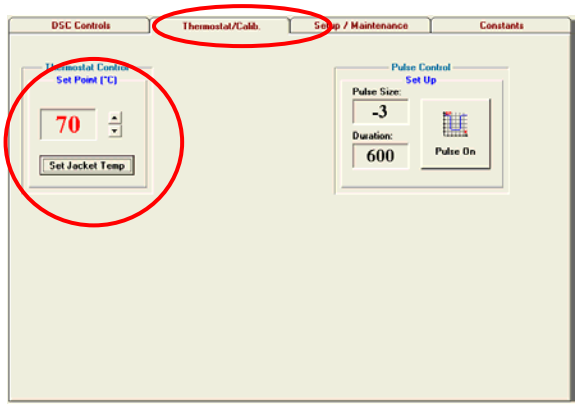
システムを長期間使用しない場合には、サンプルセルおよびリファレンスセルに超純水を充填してください。また、定期的に（2～3 週間に 1 度）超純水の交換を行ってください。

5-4. その他のメンテナンス

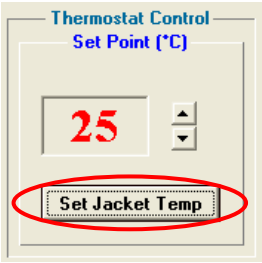
汚れがひどい時の洗浄方法（凝集が見られた場合）

通常の洗浄方法では汚れが落ちない場合や高温側で凝集が見られた場合は、より強力な洗浄を実施します。

1. セル内温度が 50℃以下であることを確認して、ガスタイトシリンジを用いてセル内の溶液を取り出します。
2. セルクリーニングデバイスを用いて、超純水で 30 秒間洗浄した後、セル内に残っている水をガスタイトシリンジで取り除きます。
3. 20% Contrad-70 (Decon90) 溶液をセルに充填します。
4. ***VPViewer2000*** の ***Main Window*** 内にある ***Thermostat / Calib*** のタブを選択します。
5. ***Thermostat Control*** でセルジャケットの温度を 70℃に設定します。
   Set Point (℃) に 70 と入力して、***Set Jacket Temp*** ボタンを押します。



6. 70℃で 1 時間保持します。
7. 1 時間後に ***Thermostat Control*** でセルジャケットの温度を 25℃に設定します。



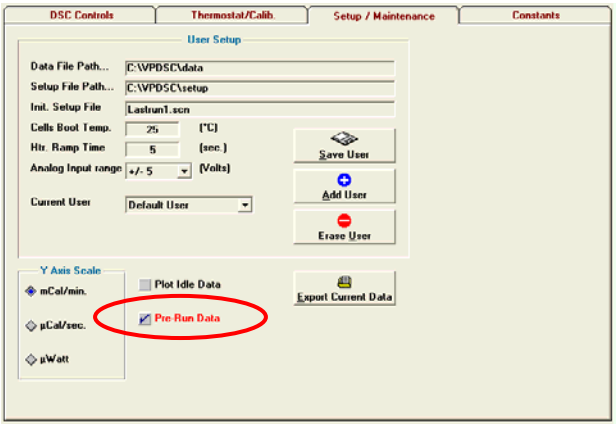
8. 設定温度に達したら、ガスタイトシリンジを用いてセル内の 20% Contrad-70 (Decon90) 溶液を取り出します。
9. セルクリーニングデバイスを接続して超純水で 5 分洗浄を行います。
10. セル内に残っている水をガスタイトシリンジで取り除きます。
11. 20% Contrad-70 (Decon90) 溶液での洗浄後は、次項のシステムチェックもしくはコントロールスキャン（バッファースキャン）による、ベースライン安定性の確認をおすすめします。

5-5. システムチェック

システムのコンディションを確認するために、サンプルセル、リファレンスセルの両方に超純水を充填して水スキャン測定を行います。ベースラインのドリフトや、再現性のないピークが出ないかどうかを確認することにより、システムの状態を把握することができます。

再現性のないピークやベースラインの再現性が低いなどの問題点がございましたら、弊社にご連絡いただき、測定結果をお送りください。

1. ***VPViewer2000*** の ***Setup / Maintenance*** ウィンドウを開き ***Pre-Run Data*** にチェックを入れます。



2. サンプルセル、リファレンスセルに脱気済みの超純水を充填します。
（メンテナンス後に実施する場合は超純水でセルの洗浄を十分に行ってください）

3. ***Feed Back Mode/Gain*** は ***None*** を選択し、***VPViewer2000*** の ***DSC Controls*** タブをクリックして、以下のパラメータを入力後、***Start*** ボタンを押して水スキャン測定を開始します。

Experimental Parameters

Number of Scans：	10
Post Cycle Thermostat (℃)：	25
Cell Concentration (mM)：	0

Scan Parameters

Starting Temperature (℃)：	10
Final Temperature (℃)：	110
ScanRate (℃/Hr)：	90
PreScan Thermostat (min)：	15
PostScan Thermostat (min)：	0
Filtering Period (sec)：	30

5-6. 熱量キャリブレーション

既知の電気パルスをセルにかけた時、同等（誤差 1%以内）の熱量レスポンスが得られているかを確認します。

1. サンプルセル、リファレンスセルの両方に超純水を充填します。
2. ***Feed Back Mode/Gain*** は ***None*** を選択し、***DSC Controls*** タブ内のパラメータを以下のように設定します。

Experimental Parameters

Number of Scans :	1
Post Cycle Thermostat (℃) :	25
Cell Concentration (mM) :	0

Scan Parameters

Starting Temperature (℃) :	10
Final Temperature (℃) :	110
ScanRate (℃/Hr) :	60
PreScan Thermostat (min) :	15
PostScan Thermostat (min) :	0
Filtering Period (sec) :	16

3. ***Start*** ボタンをクリックすると測定を開始します。
4. 測定が開始され、DP が安定したら、昇温中に ***Thermostat/Calib.***タブ内にある ***Pulse Control*** ボックス内の ***Setup*** のパラメータを ***Pulse Size*** を「-5」、***Duration*** を「300」にセットし、***Pulse On*** ボタンを押します。
5. パルスの出力が終了しますと、モニター上にスクリプトウィンドウが自動で表示され、誤差範囲が表示されます。誤差が±1%以内であれば問題ありませんが、誤差が±1%以上であったり、パルスが出力されていないようなことがありましたら、弊社までご連絡ください。

5-7. 温度キャリブレーション

既知の溶解温度を持つ炭化水素鎖が封入されたキャピラリーチューブをセルに挿入して測定し校正を行います。約 1 年に 1 度行うことをおすすめいたします

1. ***VPViewer2000*** のアイコンをクリックして、測定制御用ソフトウェアを立ち上げます。
2. サンプル、リファレンス両セルに脱気した超純水を充填します。
3. 圧力キャップをはずした状態でサンプルセル、リファレンスセルに炭化水素鎖のワックスが入ったキャピラリーチューブをそれぞれ挿入します。（短いキャピラリーチューブをリファレンスセルに、長いキャピラリーチューブをサンプルセルに挿入します）
4. ***Feed Back Mode/Gain*** は ***mid*** を選択し以下のパラメータを入力後、***Start*** ボタンを押して測定を開始します。

Experimental Parameters

Number of Scans：	2
Post Cycle Thermostat (℃)：	25
Cell Concentration (mM)：	0

Scan Parameters

Starting Temperature (℃)：	10
Final Temperature (℃)：	80
ScanRate (℃/Hr)：	60
PreScan Thermostat (min)：	15
PostScan Thermostat (min)：	0
Filtering Period (sec)：	2

5. 測定終了後、Origin DSC ソフトウェアでファイルを開きます。
6. メニューバーの ***Tools*** から ***Pick Peaks*** を選び、***Find Peaks*** をクリックします。
7. 表示されたピークが 28.2±2℃、75.9±2℃のスペック内に入っていることを確認してください。

6. 消耗品の品名とコード番号

製品名	製品概要	包装	コード番号
Syringe, Hamilton, 2.5 ml, 4.375", 20GA,	充填用シリンジ。	1	SYN161709
Filling Tube, Acrylic	セルにサンプル、またはバッファーを充填するために使うツール。サンプル量が少ない（～1 ml）時使用。	1	MSP12021
Cellport Funnel Assembry	セルにサンプル、またはバッファーを充填するために使うツール。サンプル量が多い（1 ml～）時使用。	1	MSA12030
O-ring, Viton, 016 (Pack of 10) (I.D. x O.D.) 15.9 x 19.1 mm	セル部分に使用する O-リング。	10	ORG00016V-010
Test Kit, DSC, RNase/2'CMP	装置の動作確認および実験練習用の標準サンプル	1	KIT100010

GE Healthcare

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止　⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

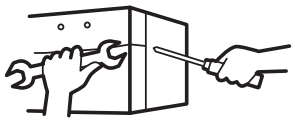
●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

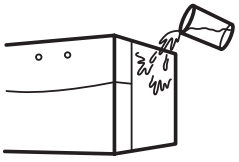
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

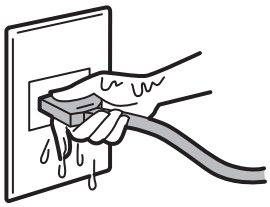
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

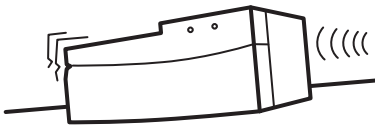
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

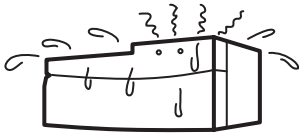
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL : 03-5331-9336

受付時間 9 : 00 ～ 17 : 30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■機器メンテナンス・保守契約・修理のお問合せ

● **TEL：03-5331-9315**

● **FAX：03-5331-9349**

■テクニカルのお問合せ（バイオダイレクトライン）

● **TEL：03-5331-9336**

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

クロマトグラフィー関連製品 ：1
ビアコア・MicroCal 関連製品：2
電気泳動関連製品 ：3
その他製品 ：4

● **FAX：03-5331-9370**

● **e-mail：Tech-JP@ge.com**

※ アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。
※ 主な製品マニュアルや製品 Q&A、ユーザートレーニング・Science Program の日程等は弊社 Web サイトで公開していますのであわせてご活用ください。

www.gelifesciences.co.jp

©2012 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

Intertek
ISO 9001:2008
認証取得

取扱店